

Mise au point d'une méthode pour l'étude des caractères morphologiques, biochimiques et nutritionnels des champignons imparfaits

Sévastianos Roussos*

Résumé

Quelques souches de champignons filamenteux appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Trichoderma* ont été utilisées pour la mise au point d'une méthode d'étude des moisissures. Les caractères morphologiques (croissance apicale, conidiophores, conidies, mycélium) ont été retenus pour la description des souches, puis un protocole expérimental a été mis au point pour suivre l'assimilation des sucres ainsi que la biosynthèse d'enzymes par ces microorganismes au cours de leur croissance.

Mots-clés : *Aspergillus* — *Trichoderma* — *Penicillium* — Amylases — Cellulases — Assimilation des sucres — Caractères morphologiques.

Abstract

A few strains of filamentous fungi belonging of the genera of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* have been used to improve a new method to study the fungi. Some morphological characteristics (apical growth, conidiophore, conidia, mycelium) have been chosen to describe strains, then an experimental method has been developed to study sugar assimilation and also the biosynthesis of enzymes by these microorganisms during their growth.

Key words : *Aspergillus* — *Penicillium* — *Trichoderma* — Amylase — Cellulase — Sugar assimilation — Morphological characteristics — Taxonomy.

1. Introduction

L'identification des champignons filamenteux est actuellement basée essentiellement sur des critères morphologiques (RIFAI, 1969; RAPER et FENNELL, 1977; PITT, 1979; SAMSON *et coll.*, 1981). L'utilisation croissante des champignons filamenteux pour la bioconversion de substrats agro-alimentaires rend nécessaire une meilleure connaissance de ces microorganismes : potentialités métaboliques, caractères nutritionnels.

Récemment DOMSCH *et coll.* (1980) ont utilisé les caractères morphologiques pour décrire des champignons isolés à partir du sol et ont fait suivre cette description de données bibliographiques sur les

capacités métaboliques des souches étudiées, mais cette étude ne comporte pas de recherche méthodologique.

Les champignons filamenteux les plus fréquemment utilisés dans le domaine des fermentations appartiennent à la classe des Deutéromycètes ou champignons imparfaits qui comprend quelques espèces capables de produire des toxines. Cette classe de champignons regroupe des genres pour lesquels seul le cycle de reproduction asexuée (conidies) est connu. Nous avons retenu pour notre étude les genres suivants : *Aspergillus*, *Penicillium* et *Trichoderma*.

La présente étude porte sur la mise au point d'une méthode standard d'analyse globale de caractères phénotypiques de trois types : morphologiques, nutritionnels et biochimiques.

* Laboratoire de Microbiologie O.R.S.T.O.M. IRCHA, B.P. n° 1, 91 710 Vert-le-Petit, France.

Adresse actuelle: Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie O.R.S.T.O.M., B.P. n° 81, 97201 Fort-de-France.

2. Matériel et méthodes

2.1. MICROORGANISMES

Les souches utilisées proviennent de la collection Tchèque de Microorganismes de Brno (CCM) à l'exception de la souche An 10 qui a été isolée à partir d'un sol Tropical (tabl. I).

2.2. MILIEUX DE CULTURE

La description des caractères morphologiques des souches a été faite sur Malt-Agar après culture de

7 jours à 29 °C. La croissance apicale du mycelium a été mesurée sur différents milieux (Malt-Agar, Czapek-Dox, MANDELS et WEBER, 1969) en utilisant la technique en tubes (RYAN *et coll.*, 1943).

Pour l'étude de la physiologie et du métabolisme des champignons filamenteux, on a utilisé un milieu entièrement synthétique dont la composition est la suivante : $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$: 1 g; urée : 0,3 g; $\text{K H}_2\text{PO}_4$: 1,3 g; Na_2HPO_4 : 0,12 g; MgSO_4 : 0,30 g; CaCl_2 : 0,30 g; solution d'oligo-éléments (1) : 1 ml; solution de vitamines (2) : 1 ml; source de carbone : 2 g; eau distillée : 1 000 ml; pH : 5,6. La solution de vitamines et la source de carbone sont stérilisées par

TABLEAU I

N° ORSTOM	NOM DE L'ESPECE	PROVENANCE
An 10	<i>Aspergillus niger</i>	Sol, Sénégal
An 22	<i>Aspergillus niger</i>	CCM, F-330
Af 21	<i>Aspergillus flavus</i>	CCM, F-449
Ao 8	<i>Aspergillus oryzae</i>	CCM, F-172
Av 24	<i>Aspergillus versicolor</i>	CCM, F-620
Pc 27	<i>Penicillium camemberti</i>	CCM, F-378
Th 15	<i>Trichoderma harzianum</i>	CCM, F-470

CCM : Czechoslovak Collection of Microorganisms.

filtration (filtre Millipore, 0,45 μ); le milieu minéral est autoclavé à 110 °C pendant 30 mn.

Le milieu synthétique est réparti dans des fioles coniques de 125 ml (Belco réf. 2510). Les substrats carbonés utilisés sont les suivants : Glucose, Xylose, Lactose, Saccharose, Cellobiose, Amidon et

Cellulose microcristalline. L'inoculation des milieux de culture se fait avec une suspension de spores (10^7 spores/g de sucre).

La température d'incubation est de 20 °C pour *P. camemberti* et de 29 °C pour les autres souches. Les cultures ne sont pas agitées. Après 7 jours

(1) Solution d'oligoéléments : $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 5,0 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 1,6 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 1,4 g; CaCl_2 : 2,0 g; Eau distillée : 1 000 ml.

(2) Solution de vitamines : Biotine : 20 mg; Ac. folique : 20 mg; Pyridoxine-HCl : 100 mg; Thiamine-HCl : 50 mg; Riboflavine : 50 mg; Ac. Nicotinique : 50 mg; D-L-Pantothénate de Ca : 50 mg; Vitamine B 12 : 1 mg; Ac. P-aminobenzoïque : 50 mg; Ac. lipoïque : 50 mg; Eau distillée : 1 000 ml.

d'incubation, les cultures sont homogénéisées à l'ultra-turrax puis centrifugées à 6 000 t/mn pendant 15 mn. Les culots sont repris et lavés deux fois à l'eau distillée (fig. 1). Dans les culots ainsi lavés, on dose les protéines au Technicon selon la technique de LOWRY *et coll.* (1951).

Les sucres réducteurs résiduels ainsi que les activités amylasique et carboxyméthyl-cellulasique (CMC) sont dosés dans le surnageant au moyen du Technicon selon la Méthode de PARK et JOHNSON (1949).

Pour l'activité amylasique

1 ml du surnageant + 4 ml d'une solution tampon citrate 0,05 M de pH 4,5 renfermant 1 % d'amidon sont incubés à 50 °C pendant 15 mn. On arrête la réaction par un traitement de 5 minutes à 100 °C.

Pour l'activité CMC

1 ml du surnageant + 1 ml d'une solution tampon citrate-phosphate de pH 4,8 renfermant 1 % de CMC sont portés dans un bain-marie à 50 °C,

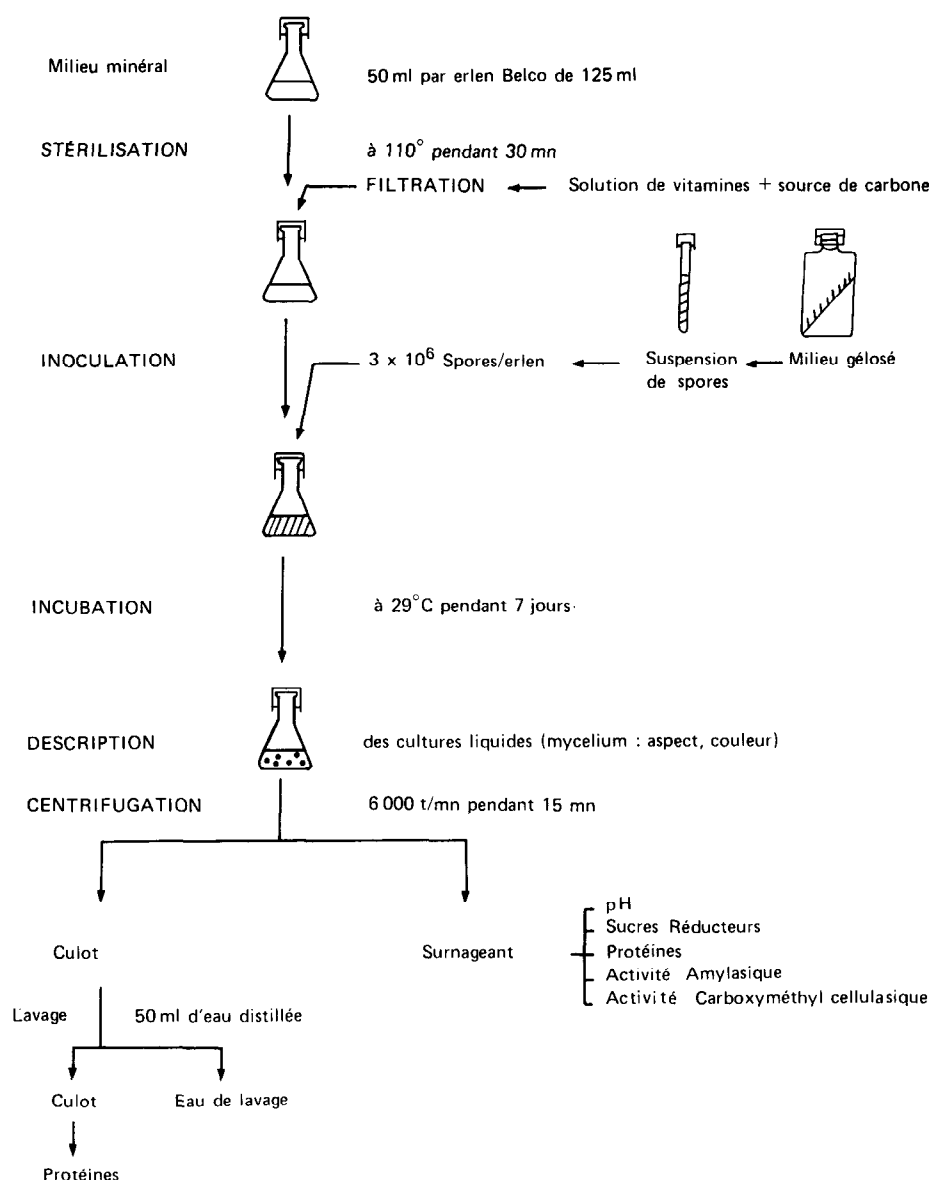


Fig. 1. — Schéma représentant les différentes étapes expérimentales pour l'étude des caractères biochimiques et nutritionnels.

TABLEAU II
Description des caractères morphologiques

	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i> 10	<i>A. niger</i> 22	<i>A. oryzae</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>A. harzianum</i>	<i>P. camemberti</i>
<u>Description en milieu gélosé</u>							
<u>Croissance apicale mm/h</u>							
Czapek Dox	0,13	0,20	0,20	0,25	0,06	0,95	0,09
Malt Agar mm/h	0,12	0,23	0,25	0,16	0,08	1,25	0,08
Cellulose	0,21	0,20	0,20	0,22	0,20	0,88	-
<u>Conidies</u>							
Quantité nb/GSPS	9×10^{10}		$6,2 \times 10^9$	7×10^9	$1,25 \times 10^{10}$	$3,25 \times 10^{10}$	
Couleur							
. blanche	-	-	-	-	+	-	-
. jaune vert	+	-	-	+	±	±	±
. vert	+	-	-	+	±	+	+
. noir	-	+	+	-	-	-	-
<u>Conidiophores</u>							
. <i>Aspergillus</i>	+	+	+	+	+	-	-
. <i>Penicillium</i>	-	-	-	-	-	-	+
. Autres	-	-	-	-	-	+	-
<u>Stipe</u>							
hyalin	+	+	+	+	+	-	-
lisse	-	+	+	-	+	-	-
taille	2,5 µ			4,5 mm		-	
<u>Cellule podale</u>							
- vésicule	+	+	+	+	+	-	-
. subglobuleuse	+	+	+	+	+	-	-
. ellipsoïdale	-	-	-	-	±	-	-
taille	25-45 µ	50-100 µ	50-100 µ	40-80 µ	12 - 16 µ	-	-
- métule	±	+	+	±		-	+
taille	8 x 4 µ	20 x 5 µ	20 x 5 µ	10 x 4 µ	6 - 2 µ	-	12 x 3 µ
septée		±	±			-	+
- phialide							
forme		8					
taille	8 x 5 µ	8 x 4 µ	8 x 4 µ	13 x 4 µ	7 - 3 µ	6 x 3 µ	12 x 2,5 µ
<u>- Conidies</u>							
. globuleuses	+	+	+	+	+	+	+
. échinulées	±	++	+	±	±	-	-
. en amas		-	-			+	-
. en chaînes		+	+			-	+
taille	3 - 6 µ	3 - 5 µ	3 - 5 µ	4 - 8 µ	2 - 3 µ	3 x 2,5µ	3 - 4 µ
forme ellipsoïdale				+			-
- Sclérote	±	-	-			-	-
- Chlamydo-spores						+	-
<u>En milieu liquide agité</u>							
. pellets	+	+	+	+	+	-	-

pendant 30 mn. La réaction est stoppée par un traitement de 5 minutes à 100 °C.

3. Résultats et discussion

3.1. CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Au tableau II sont rapportées la vitesse de croissance apicale, la production quantitative des conidies et les caractéristiques des conidiophores et des conidies.

Plusieurs mesures de croissance apicale ont été effectuées dans le temps pour vérifier que la vitesse de croissance apicale d'un champignon filamentueux est un caractère stable. Les résultats obtenus confirment cette hypothèse et démontrent que chaque espèce de champignon microscopique possède une vitesse d'élongation apicale qui lui est propre et qui le caractérise. Cette vitesse n'est pas influencée par la nature de la source de carbone du milieu de culture lorsque celui-ci est un milieu synthétique. Les *Aspergillus* ainsi que le *Penicillium* étudié sont caractérisés par une croissance apicale faible contrairement

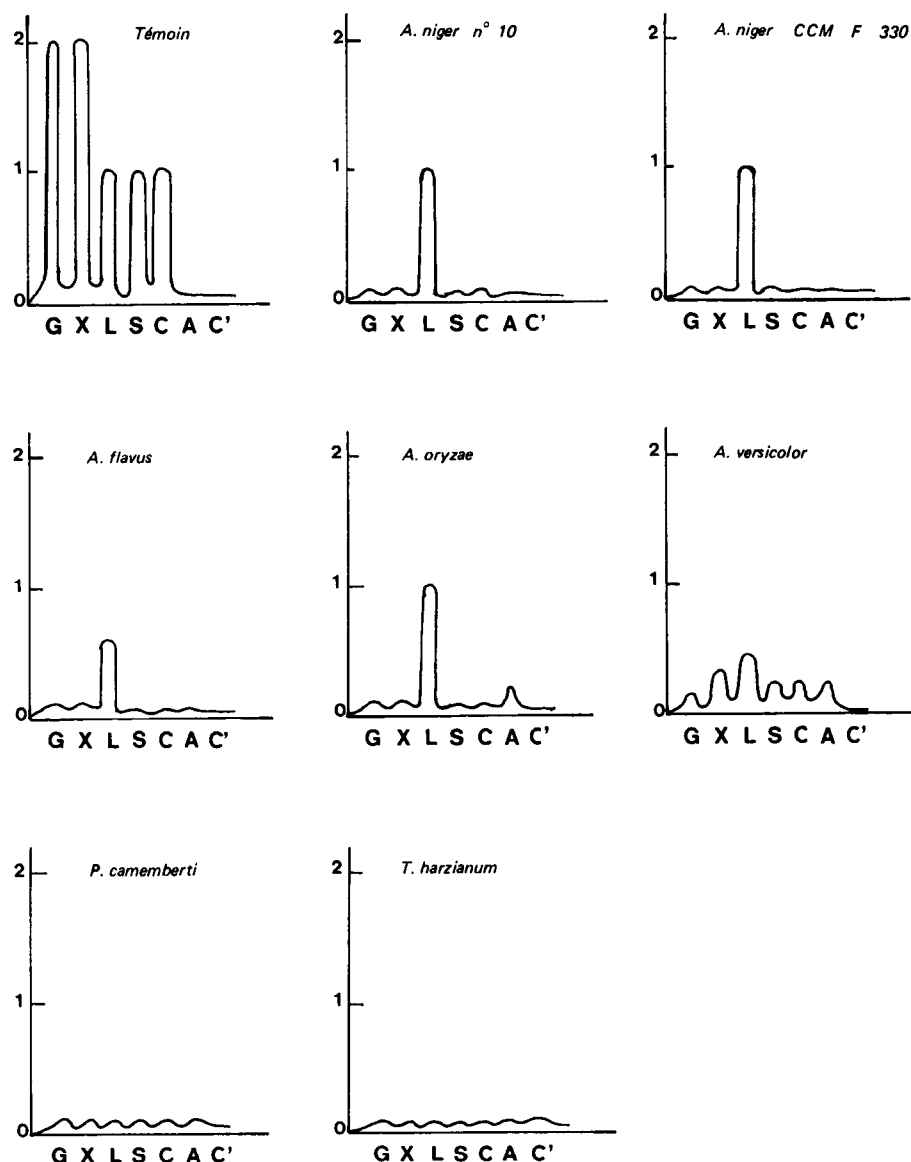


Fig. 2. — Sucres réducteurs résiduels (mg/ml).

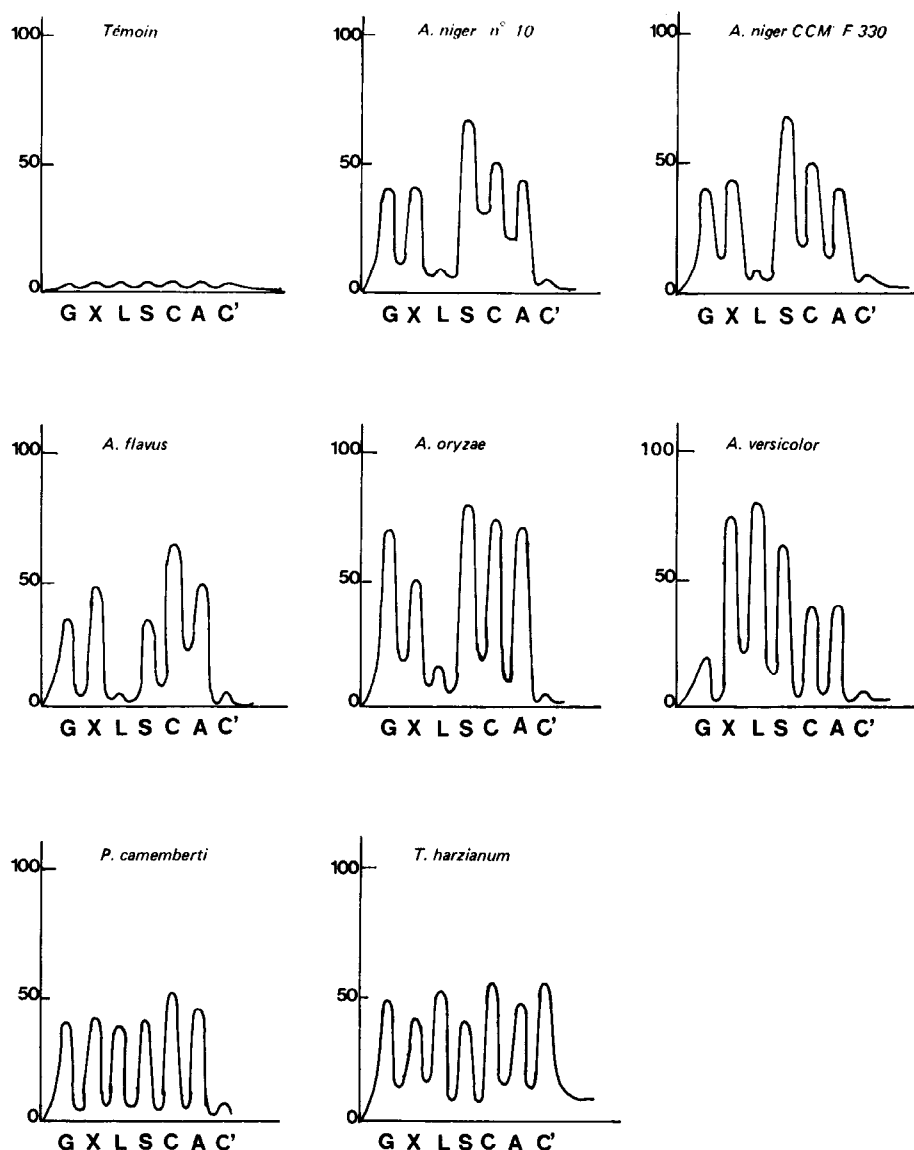


Fig. 3. — Protéines dans le culot (mg/l).

au *Trichoderma* qui a une croissance apicale voisine de 1 mm/h.

3.2. CARACTÈRES NUTRITIONNELS

L'utilisation des sucres par les *Aspergillus*, *Penicillium* et *Trichoderma* étudiés est rapportée à la fig. 2. Sur milieu entièrement synthétique contenant une très faible quantité de vitamines, on obtient une croissance importante sur glucose, xylose et cellobiose. Le lactose est assimilé entièrement par *T. harzianum* et *P. camemberti* mais non par *A. niger*

et *A. oryzae* qui ne l'utilisent pas. *A. versicolor* utilise seulement la moitié du lactose présent dans le milieu et *A. flavus* l'utilise encore moins.

Ces résultats sont en accord avec ceux de MARGARIS *et coll.* (1974), sur *A. niger*, de BANSAL et GROVER (1971) sur *A. flavus*, KONDU et DAS (1970) et GANDHI *et coll.* (1974), sur *A. oryzae* et de TRIQUE (1968), sur *A. versicolor*.

Une méthode d'analyse automatique (PARK et JOHNSON, 1949) a été utilisée pour le dosage des sucres réducteurs présents dans le milieu avant (témoin) et après la culture des différentes souches.

Pour le saccharose, le lactose et le cellobiose, le résultat obtenu doit être multiplié par le coefficient 2. Cette méthode ne permet pas de doser l'amidon et la cellulose.

La croissance des microorganismes à partir d'un substrat donné a également été mesurée par dosage des protéines dans le culot de centrifugation des cultures.

A la figure 3 sont rapportées les quantités de protéines présentes dans les culots après 7 jours de culture des *Aspergillus*, *Penicillium* et *Trichoderma* étudiés. La croissance du mycelium et la biosynthèse

des protéines dépendent de la source de carbone utilisée. C'est ainsi qu'en général la production de protéines varie avec la source de carbone à l'exception de *P. camemberti* pour lequel la concentration en protéines du culot est la même quel que soit le sucre utilisé. Et pour un même sucre, par exemple le glucose qui est utilisé par l'ensemble des souches, la quantité de protéines synthétisées varie suivant l'espèce, les cultures étant réalisées dans les mêmes conditions expérimentales.

L'analyse des protéines permet donc de vérifier et compléter les résultats obtenus par le

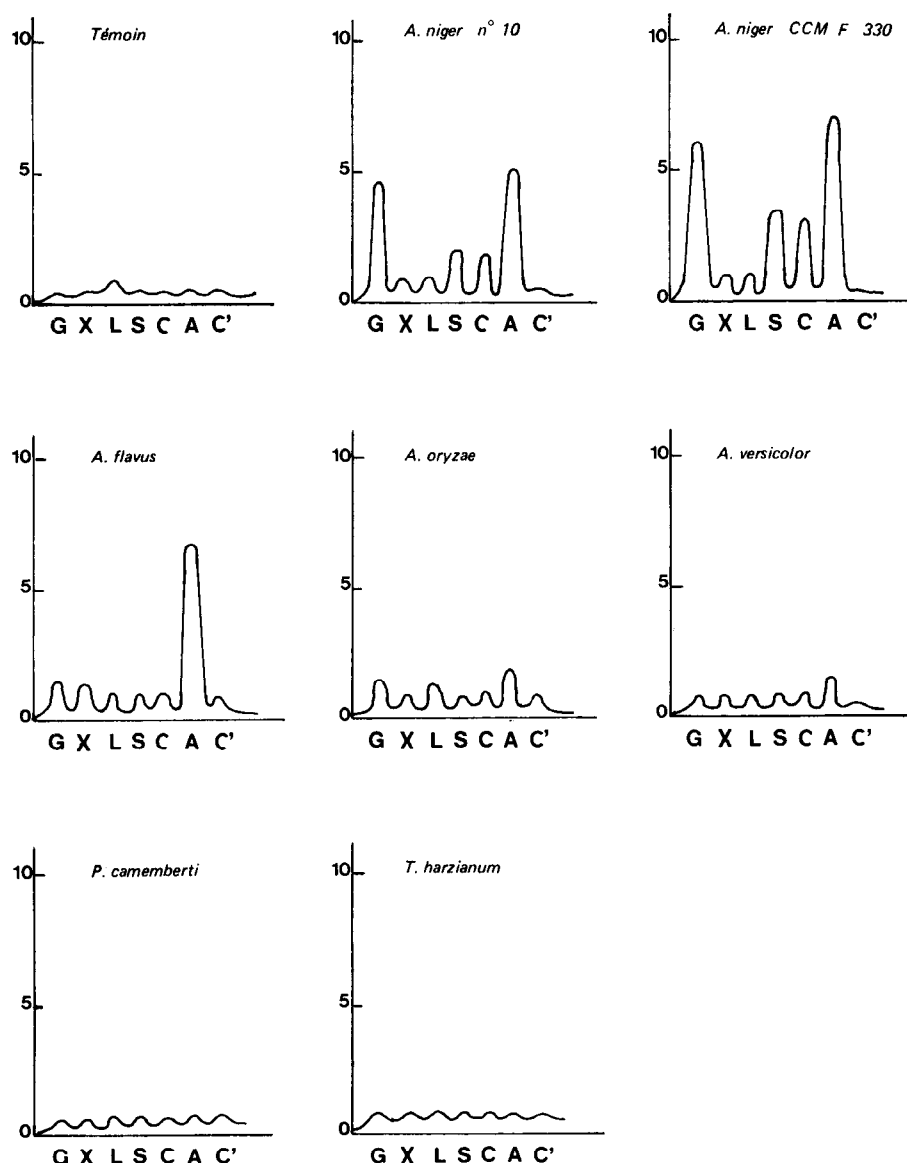


Fig. 4. — Activités amylasiques dans le surnageant (mg de glucose libéré après 15 mn/ml).

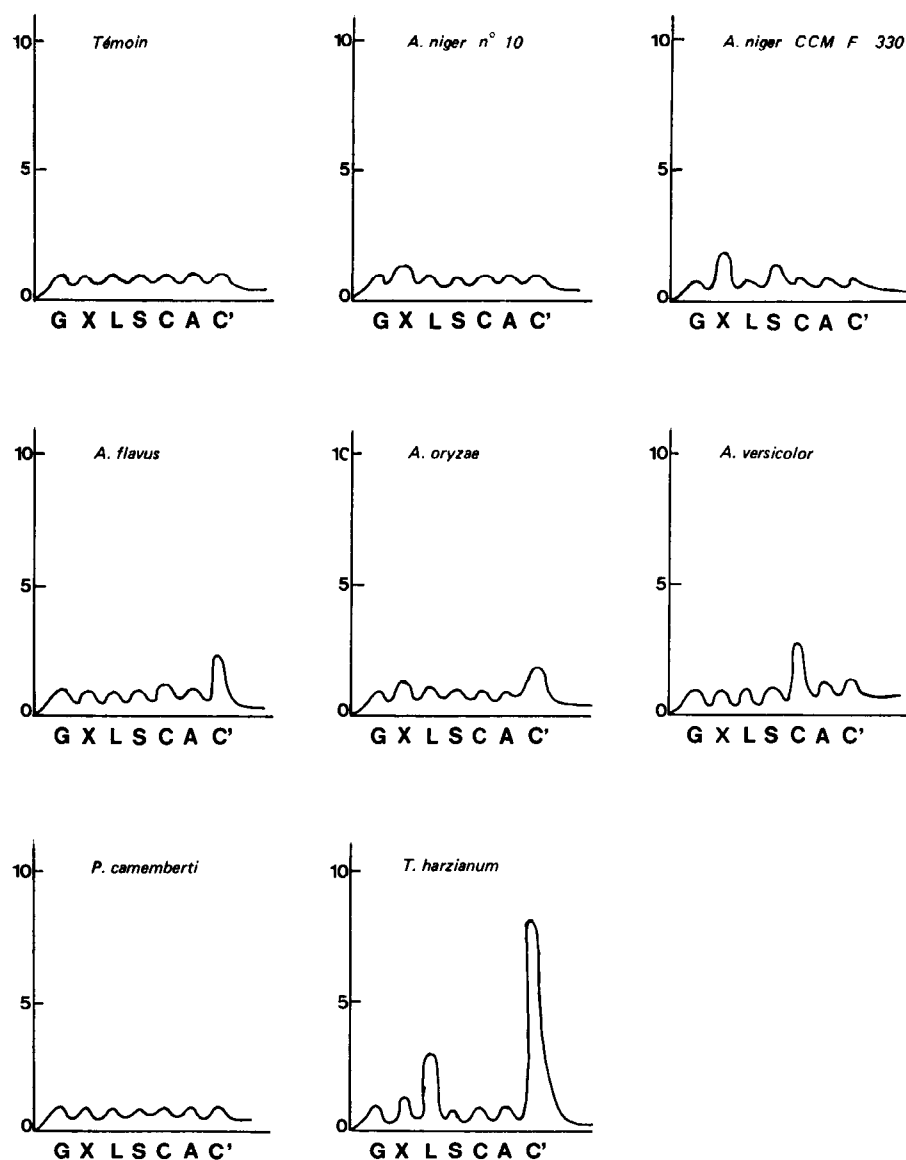


Fig. 5. — Activités CMCase (mg de glucose libéré après 30 mn/ml).

dosage des sucres réducteurs résiduels. Cependant, il faut l'utiliser avec prudence, car elle présente quelques inconvénients; elle ne prend pas en considération la lyse du mycelium et par conséquent la libération de protéines solubles dans le surnageant. Il est d'autre part déconseillé d'estimer la croissance d'un microorganisme par le dosage des protéines présentes dans le surnageant. En effet, quelques sucres, libérés au cours de la croissance dans le surnageant ou non dégradés, influencent le résultat. Ainsi la présence de lactose ou de glucose dans le surnageant influence le dosage des protéines au Folin

et fausse complètement les résultats (O'SULLIVAN et MATHISON, 1970).

3.3. CARACTÈRES BIOCHIMIQUES

L'influence de la source de carbone sur l'activité amylasique est mise en évidence par les résultats rapportés à la figure 4. Tous les microorganismes testés dégradent l'amidon, mais seules les souches d'*Aspergillus* ont une activité amylasique importante.

Le spectre regroupant les activités amyla-

siques obtenues sur les différents substrats carbonés est analogue pour les deux souches : *A. niger* 10 et CCM-F-330, cependant la souche de collection produit plus d'amylases que la souche sauvage n° 10. Pour ces deux souches, le glucose, le saccharose et le cellobiose ne sont pas des répresseurs à la concentration utilisée (2 g/l) ; ils agissent au contraire comme des inducteurs. Par contre, pour la souche d'*A. flavus* qui produit autant d'amylases que la souche d'*A. niger* lorsqu'elle est cultivée sur amidon, le glucose, le saccharose et le cellobiose agissent plutôt comme répresseurs de la synthèse des amylases.

Le phénomène d'induction de la biosynthèse des amylases au cours de la croissance d'*A. niger* sur différents sucres a déjà été décrite par BARTON *et coll.* (1972) et GANDHI *et coll.* (1974) : l'amidon, le glucose et le maltose agissent comme des inducteurs. Pour *A. flavus*, HESSELTINE *et coll.*, 1970, ont également décrit une production d'amylases.

On note également que *A. oryzae* présente un spectre des activités amylasiques très différent de celui d'*A. flavus*. Cette observation peut éventuellement contribuer à différencier ces deux espèces morphologiquement très proches (SAMSON *et coll.*, 1979).

Les cellulases produites par les champignons filamenteux sont des enzymes adaptatives (MANDELS et WEBER, 1969). Parmi les souches que nous avons étudiées, seule une souche de *T. harzianum* donne une culture abondante sur cellulose (fig. 5). Cette souche se développe bien sur les autres sucres testés, mais les activités cellulasiqes ne sont cependant produites abondamment que sur cellulose et en faible quantité sur lactose à la concentration de 2 g/l. Le cellobiose n'est pas un inducteur, mais il agit plutôt comme répresseur (fig. 5).

Conclusions

L'identification des champignons filamenteux, basée uniquement sur des critères morphologiques, n'est pas aisée lorsque les microorganismes sont très proches (*A. flavus*-*A. oryzae*). En outre, lorsque des microorganismes doivent être utilisés en biotechnologie, il faut une description plus complète de leurs caractères biochimiques et nutritionnels.

Pour suivre l'assimilation d'un substrat, dans des conditions bien définies, on peut soit suivre son épuisement dans le milieu de culture, soit suivre sa transformation en protéines ou autres métabolites. Dans le cas présent, nous avons dosé les sucres réducteurs résiduels après une culture de 7 jours. Nous avons pu suivre ainsi l'évolution du glucose, xylose, cellobiose, lactose et mettre en évidence l'épuisement des trois premiers par l'ensemble des souches et la non utilisation du dernier par les *Aspergillus*. Nous avons dosé parallèlement les protéines contenues dans le culot de culture et biosynthétisées au cours de la croissance des microorganismes.

Cette nouvelle méthode d'étude des caractères biochimiques et nutritionnels des champignons filamenteux peut être un outil de travail appréciable pour caractériser les souches par : le taux de production de protéines à partir d'un substrat simple, la versatilité nutritionnelle d'un microorganisme, la nature et l'intensité des différentes activités enzymatiques (amylases, cellulases...). Ces données peuvent être particulièrement intéressantes pour une éventuelle utilisation des champignons filamenteux dans le domaine des bioconversions et la valorisation des déchets agricoles.

Manuscrit reçu au Service des Éditions le 7 octobre 1982

BIBLIOGRAPHIE

- BANSAL (R. D.) et GROVER (R. K.), 1971. — Effect of alcohols and organic acids on growth, sporulation and subsequent spore germination of *Aspergillus flavus*. *SYDOWIA*, 25 : 167-171.
- BARTON (L. L.), GEORGI (C. E.) et LINEBACK (D. R.), 1972. — Effect of maltose on glucoamylase formation by *A. niger*. *J. Bact.*, 111 : 771-777.
- DOMSCH (K. H.), GAMS (W.) et ANDERSON (T. H.), 1980. — Compendium of soil fungi Vol. I, II. Academic Press, London, 859+405 pp.
- GANDHI (A. P.), BARAT (G. K.) et DAS (N. B.), 1974. — Studies on the production of fungal amylases. *Mycopath. Mycol. Appl.*, 52 : 307-311.
- HESSELTINE (C. W.), SORENSON (W. G.) et SMITH (M.), 1970. — Taxonomic studies of the aflatoxinproducing strains in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia*, 62 : 123-132.
- KUNDU (A. K.) et DAS (N. B.), 1970. — Production of amylases in liquid culture by a strain of *A. oryzae*. *Appl. Microbiol.*, 19 : 598-603.
- LOWRY (O. H.), ROSEBROUGH (N. J.), FARR (A. L.) et RANDALL (R. J.), 1951. — Protein Measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- MANDELS (M.) et WEBER (J.), 1969. — The production of cellulases. In: Cellulases and their applications. *Advan. Chem. Ser.*, 95 : 391-414.
- O'SULLIVAN (J.) et MATHISON (G. E.), 1970. — Interference by monosaccharides with the estimation of tyrosine and proteins using the Folin — Ciocalteu phenol reagent. *Analyt. Biochem.*, 35 : 540-542.
- PARK (J. T.) et JOHNSON (M. J.), 1949. — A submicrodetermination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 181 : 149-151.
- PITT (J. I.), 1979. — The genus *Penicillium* and its teleomorphic states of *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Acad. Press. London, 634 pp.
- RAPER (K. B.) et FENNELL (D. I.), 1977. — The genus *Aspergillus*. Krieger Ed. New York, 686 pp.
- RIFAI (M. A.), 1969. — A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Papers*, 116 : 1-56.
- RYAN (F. J.), BEADLE (G. W.) et TATUM (E. L.), 1943. — The tube method of measuring the growth rate of *Neurospora*. *Amer. J. Botan.*, 30 : 784-799.
- SAMSON (R. A.), HOEKSTRA (E. S.) et VAN OORSCHOT (C. A. N.), 1981. — Introduction to food-borne fungi. CBS ed. Baarn, 247 pp.
- TRIQUE (B.), 1968. — Croissance et sporulation de l'*Aspergillus versicolor* et de *Penicillium cyclopium* en fonction des sources de carbone et d'Azote. *Mém. Soc. Bot. Fr.*, 115 : 101-109.